

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-248500

(43)Date of publication of application : 29.10.1987

(51)Int.Cl.

C12Q 1/48
C12Q 1/40
// G01N 21/75

(21)Application number : 61-091318

(71)Applicant : KANTO KAGAKU KK

(22)Date of filing : 22.04.1986

(72)Inventor : ONO TOSHIHIRO
ONIZUKA TOSHIHIRO

(54) REAGENT FOR DETERMINATION OF ENZYMATIC ACTIVITY

(57)Abstract:

PURPOSE: To prevent the lowering of the measured value caused by hemoglobin, etc., produced by hemolytic action, by adding thiourea to a reagent used in the determination of an enzymatic activity in serum by the absorbance of light of a specific wavelength range.

CONSTITUTION: The activity of an enzyme such as α -amylase, γ -glutamyl transferase, etc., in serum is determined by the absorbance of light of 400W450nm wavelength. In the above process, usually $\geq 0.01\text{wt}\%$ thiourea is added to a solution of a reagent composed of a substrate (e.g. 2-chloro-4-nitrophenyl- β -D- maltoheptaoxide, etc.), etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁 (J P)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭62-248500

⑫ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月29日

C 12 Q 1/48

8412-4B

1/40

8412-4B

// G 01 N 21/75

8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 酵素活性測定用試薬

⑮ 特 願 昭61-91318

⑯ 出 願 昭61(1986)4月22日

⑰ 発 明 者 小 野 敏 広 川崎市多摩区三田1-13-1-202

⑱ 発 明 者 鬼 塚 敏 宏 森野市曲松1-10-23

⑲ 出 願 人 関東化学株式会社 東京都中央区日本橋本町3丁目7番地

⑳ 代 理 人 弁理士 南 孝 夫

明 細 書

1 発明の名称

酵素活性測定用試薬

2 特許請求の範囲

1 血清中の酵素活性を測定するために、400 nm~450 nm の領域で吸光度を測定する方法に使用する酵素活性測定用試薬において、デオ尿素を含有せしめたことを特徴とする血清中の酵素活性測定用試薬。

2 前記の酵素が、 α -アミラーゼである特許請求の範囲第1項記載の酵素活性測定用試薬。

3 前記の酵素が、 Γ -グルタミルトランスフェラーゼである特許請求の範囲第1項記載の酵素活性測定用試薬。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、医学上、臨床検査その他に有用な、血清中の酵素活性測定に使用される試薬に関するものである。

(従来技術)

従来、血清中の酵素活性の測定は、医学的診断において重要な役割を分担するものとして重用されているが、その測定方法の一つとして、色素とある種の物質とを結合させたもの(基質)を用い、その結合が酵素の有する作用により、解離され、その結果、遊離する色素の量を、吸光度測定により、経時的に測定し、その際の単位時間あたりの吸光度の増加速度を求めて、酵素活性を算出す方法が用いられている。

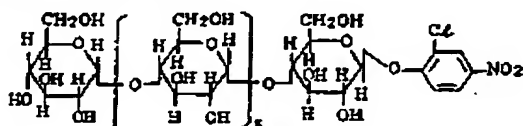
例えば、血清中の酵素として、 α -アミラーゼあるいは Γ -グルタミルトランスフェラーゼを例にとつて言えば、従来から、血清中の α -アミラーゼあるいは Γ -グルタミルトランスフェラーゼの活性を測定するには、その基質として、4-ニトロフェノール、2-クロル-4-ニトロフェノール、4-ニトロアニリン、3-カルボキシ-4-ニトロアニリン等の400 nm~450 nm に吸光度を有する物質に、多量類やアミノ酸を結合させた化合物が用いられている。

α -アミラーゼの活性測定を行なう際、用い

られる基質としては、2-クロル-4-ニトロフエニル-β-D-マルトヘプタオシド(後掲式a-1参照;以下O7-CNPと略記する)、4-ニトロフエニル-β-D-マルトヘプタオシド(後掲式a-2参照;以下O7-PNPと略記する)、2-クロル-4-ニトロフエニル-β-D-マルトペンタオシド(後掲式a-3参照;以下O5-CNPと略記する)が有名である。

また、L-γ-グルタミルトランスフェラーゼの活性測定を行なう際用いられる基質としては、L-γ-グルタミル-4-ニトロアニリド(後掲式b-1参照;以下Ozu-4-NAと略記する)及びL-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド(後掲式b-2参照;以下Ozu-CNAと略記する)が有名である。

式a-1:(O7-CNP)



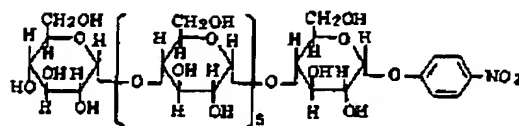
を行なう場合、まずα-アミラーゼ活性測定では、O7-CNP、O7-PNP又は、O5-CNPから生じた2-クロル-4-ニトロフエノール又は、4-ニトロフエノールの波長400~450nm域での時間経過による(経時的な)吸光度の増加すをわち、吸光度の増加速度を求め、α-アミラーゼ活性値を算出する。また、L-γ-グルタミルトランスフェラーゼ活性測定では、Ozu-4-NA又はOzu-CNAから生じた4-ニトロアニリン又は3-カルボキシ-4-ニトロアニリンの波長400~450nm域での吸光度の増加速度を求め、L-γ-グルタミルトランスフェラーゼ活性値を算出する。

このような酵素活性の求め方は、レートアッセイと呼ばれているが、このレートアッセイを詳細に説明すると以下の如くである。

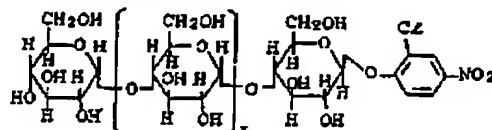
酵素活性(U/L)の算出方法

吸光度の時間経過による経時的な変化(上昇又は下降)を測定し、その測定結果より酵素活性を求める方法は、レートアッセイと呼ばれて

式a-2:(O7-PNP)

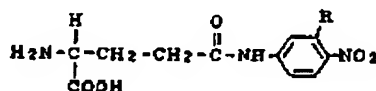


式a-3:(O5-CNP)



式b-1(R=H):(Ozu-4NA)

式b-2(R=COOH):(Ozu-CNA)



これらの基質を用いて、α-アミラーゼ又はL-γ-グルタミルトランスフェラーゼの活性測定

いる。

酵素活性U/Lとは、1分間に1mmol/Lの反応を触媒する酵素量と定義されており、吸光度(E)の経時的変化から酵素活性を求めるためには、吸光度の経時的変化(ΔE)から1分間当りの吸光度変化(ΔE/分)を算出し、さらに式に代入して酵素活性(U/L)とする方法がとられている。

$$\text{酵素活性 (U/L)} = \frac{(\Delta E/\text{分}) \times (RV + SV)}{\epsilon \times SV} \times 10^6$$

RV: 測定に使用した試薬(溶液)の液量

SV: 測定に使用した試料の液量

ε: 吸光度を測定する物質の分子吸光係数

ところで、これらの方法を用いて、血清中のα-アミラーゼ又はL-γ-グルタミルトランスフェラーゼの活性を測定を行なう際の欠点として、血清を作製する時に生ずる溶血作用により、測定したα-アミラーゼやL-γ-グルタミルトランスフェラーゼの活性値に負の誤差を生ずるとい

う現象がある(日本臨床検査自動化学会誌 Vol. 9 第冊 P141, P145(1984))。

この現象は、溶血作用により生ずるヘモグロビン及びその誘導体が、測定試液中で、光や熱により徐々に分解し、波長域 400~450nm での経時的な吸光度の減少を引き起こし、 α -アミラーゼや γ -グルタミルトランスフェラーゼの活性測定の際に測定する 400~450nm の波長域での経時的な吸光度の増加すなわち吸光度の増加速度を低下させてしまうものである。そして、その結果、測定した α -アミラーゼや、 γ -グルタミルトランスフェラーゼの活性値において負の誤差を生じてしまうこととなる。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明は、従来技術における、上記の如き波長域 400~450nm での吸光度測定において溶血作用により生ずるヘモグロビン及びその誘導体によつて引き起こされる酵素活性測定値の低下現象を防止しようとするものである。

(発明の開示)

薬の濃度の増加に従つて、抗溶血効果も増大するが、チオ尿素の濃度が必要以上に増加すると、酵素の活性を阻害してしまうため、通常は 0.2~0.25 重量%の濃度で用いるのが望ましい。

使用するチオ尿素の濃度については、検体としての血清の条件、使用する基質の種類、その他使用条件下における種々の要素により、適宜任意の至適濃度を決定すればよく、特に限定されることはない。

本発明の試薬の調製ならびにそれを用いての酵素活性の測定の方法についてはチオ尿素を使用することを除き従来の慣用技術に従つて行われる。

以下に本発明の実施例を掲げ、本発明をさらに具体的に説明する。

以下の各実施例、比較例中においては、基準となる血清として、 α -アミラーゼ 100 U/L を含有し、血清中のヘモグロビンをシアノメトヘモグロビン法で測定した結果ヘモグロビン含有していなかつた血清(S0と略記する)が用い

本発明者らは、溶血作用により生ずるヘモグロビン及びその誘導体によつて引き起こされる酵素活性測定値の低下現象を、試薬中にチオ尿素を用いることにより防止し得ることを見出した。

本発明は、かかる知見に基づいてなされたものであり、したがつて、本発明は、血清中の酵素活性を測定するため、400nm~450nm の領域で吸光度を測定する方法に使用する酵素活性測定用試薬において、チオ尿素を含有せしめたことを特徴とする血清中の酵素活性測定用試薬を提供するものである。

本発明につき、以下に詳細に説明する。

本発明においては、酵素活性測定用試薬中において、チオ尿素を用いることが特徴とされるが、酵素活性の測定を行う試薬の溶液中で 0.01 重量%以上の濃度で用いられる。この濃度によつて、溶血によつて引き起こされる酵素活性測定値の負誤差を防止する効果(以下この効果を抗溶血効果と記載する)が発揮される。チオ尿

素は、

実施例 1~5

(A) 試薬の調製:

塩化カリウム 0.05M、ナジ化ナトリウム 0.1 重量%を含有する 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にチオ尿素を溶解させて 0.2 重量%溶液とする。本溶液 1 mL に α -グルコシダーゼ 70 KU 及び β -グルコシダーゼ 10 KU を添加溶解し、さらに 07-CMP を 2.5 mM となるように加えて溶解し、 α -アミラーゼ活性測定用試薬とした(溶液 A)。

(B) ヘモグロビン含有血清の調製:

前記血清 S0 を 5 等分し、それぞれの血清に、溶血より生じたヘモグロビンを加え、それぞれの血清中に含有されるヘモグロビン濃度が 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5% となるように溶解し、それらの血清を S1, S2, S3, S4, S5 とした。

実施例 1

前記の溶液 A 3.0 mL に、試料として S1 0.05 mL を混合して、37℃で波長 405 nm における経時的な吸光度の上昇を測定し、吸光度の 1 分

間隔りの上昇度を求めた。求めた1分間当りの上昇度の値を次式に代入し、 α -アミラーゼ活性を求めた。

$$\alpha\text{-アミラーゼ活性 (U/L)} \\ = \frac{(\text{1分間当りの吸光度の上昇度}) \times 3.05}{1.11 \times 0.05} \times 1000$$

実施例 2

試料としてS2を用い、実施例1と同様の操作で α -アミラーゼ活性を測定した。

実施例 3

試料としてS3を用い、実施例1と同様の操作で α -アミラーゼ活性を測定した。

実施例 4

試料としてS4を用い、実施例1と同様の操作で α -アミラーゼ活性を測定した。

実施例 5

試料としてS5を用い、実施例1と同様の操作で α -アミラーゼ活性を測定した。

添付図面第1図において、実施例1～5の各結果が、一〇一として実施例番号を付して示さ

比較例 5

試料として前記S5を用い、比較例1と同様の操作で α -アミラーゼ活性を測定した。

各比較例の結果は、添付第1図において、一〇一として比較例番号を付して示されている。

第1図から明らかたように、O7-CNPを基質として用いる α -アミラーゼの活性測定において、本発明により、溶血によるヘモグロビンの影響が解消されることが示されている。

実施例 6～10

(A) 試薬の調製:

塩化ナトリウム 0.05M、O7-PNP 15mM、アジ化ナトリウム 0.1% 及び α -グルコシダーゼ 50 KU/L を含有する 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) にチオ尿素を加え 0.2% となるようにし、 α -アミラーゼ活性測定試薬とする (溶液A)。

(B) ヘモグロビン含有血清

前記実施例1～5、(B)に記載したS1、S2、S3、S4、S5を用いる。

実施例 6

れている。

比較例 1～5

実施例1～5で使用した前記溶液Aの成分中からチオ尿素のみを除いた組成を有する溶液 (溶液A') を調製し、それを α -アミラーゼ活性測定試薬として以下の比較例1～5に用いた。

比較例 1

溶液A' 3.0 mL に、試料として前記S1 0.05 mL を混合し、37℃で波長405nmにおける経時的な吸光度の上昇を測定し、実施例1と同様の方法で α -アミラーゼ活性を求めた。

比較例 2

試料として前記S2を用い、比較例1と同様の操作で α -アミラーゼ活性を測定した。

比較例 3

試料として前記S3を用い、比較例1と同様の操作で α -アミラーゼ活性を測定した。

比較例 4

試料として前記S4を用い、比較例1と同様の操作で α -アミラーゼ活性を測定した。

前記の溶液B 3.0 mL に試料として実施例1で使用したS1 0.05 mL を混合し、37℃で波長405nmにおける経時的な吸光度の上昇を測定し、吸光度の1分間当りの上昇度を求めた。求めた1分間当りの上昇度の値を次式に代入し、 α -アミラーゼ活性を求めた。

$$\alpha\text{-アミラーゼ活性 (U/L)} \\ = \frac{(\text{1分間当りの吸光度の上昇度}) \times 3.05}{3.53 \times 0.05} \times 1000$$

実施例 7

試料として実施例2で使用したS2を用い、実施例6と同様の操作で α -アミラーゼ活性を測定した。

実施例 8

試料として、実施例3で使用したS3を用い、実施例6と同様の操作で α -アミラーゼ活性を測定した。

実施例 9

試料として、実施例4で使用したS4を用い、実施例6と同様の操作で α -アミラーゼ活性を

測定した。

実施例 10

試料として、実施例 5 で使用した B5 を用い、実施例 6 と同様の操作で α-アミラーゼ活性を測定した。

実施例 6 ~ 10 の各結果は、添付図面第 2 図に、—●—として実施例番号を付して示されている。

第 2 図から明らかなように、O7-PNP を基質として用いる α-アミラーゼ活性測定においても、本発明により、溶血によるヘモグロビンの影響が解消されることが示されている。

実施例 11 ~ 15

(A) 試薬の調製

グリシルグリシン 20 g を 800 ml の蒸留水に溶解し、1 N-水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を 7.9 とする。本溶液に OZu-CNA 2.06 g、アジ化ナトリウム 1 g 及びチオ尿素 2.5 g を加えて溶解し、蒸留水を加えて全量を 1 L とし、α-グルタミルトランスフェラーゼの活性測定

α-グルタミルトランスフェラーゼ活性 (U/L)

$$= \frac{(1 \text{ 分間当りの吸光度の上昇度}) \times 305}{4.5 \times 0.05} \times 1000$$

実施例 12

試料として T2 を用い、実施例 11 と同様の操作で α-グルタミルトランスフェラーゼ活性を測定した。

実施例 13

試料として T3 を用い、実施例 11 と同様の操作で α-グルタミルトランスフェラーゼ活性を測定した。

実施例 14

試料として T4 を用い、実施例 11 と同様の操作で α-グルタミルトランスフェラーゼ活性を測定した。

実施例 15

試料として T5 を用い、実施例 11 と同様の操作で α-グルタミルトランスフェラーゼ活性を測定した。

実施例 11 ~ 15 の各結果は、添付図面第 3 図

試験とする (溶液 C)。

(B) ヘモグロビン含有血清の調製

基準となる血清として α-グルタミルトランスフェラーゼ 100 U/L を含有し、シアノメトヘモグロビン法で、血清中のヘモグロビンを測定した結果、ヘモグロビンを含有していなかった血清 (T0 と略記する) を使用した。T0 を 5 等分し、それぞれの血清に、溶血より生じたヘモグロビンを加え、それぞれの血清中に含有されるヘモグロビン濃度が 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5% となるように溶解し、それぞれの血清を T1、T2、T3、T4、T5 とした。

実施例 11

前記の溶液 C 3.0 ml に、試料として T1 0.05 ml を混合し、37℃で波長 415 nm における経時的な吸光度の上昇を測定し、吸光度の 1 分間当りの上昇度を求めた。求めた 1 分間当りの上昇度の値を次式に代入し、α-グルタミルトランスフェラーゼ活性を求めた。

において—○—として実施例番号を付して示されている。

比較例 6 ~ 10

実施例 11 ~ 15 で使用した溶液 C の成分中からチオ尿素のみを除いた組成を有する溶液 (溶液 D) を調製し、それを α-グルタミルトランスフェラーゼ活性測定用試薬として以下の比較例 6 ~ 10 に用いた。

比較例 6

溶液 D 3.0 ml に、試料として前記 T1 0.05 ml を混合し、37℃波長 415 nm における経時的な吸光度の上昇を測定し、実施例 11 と同様の方法で α-グルタミルトランスフェラーゼ活性を求めた。

比較例 7

試料として前記 T2 を用い、比較例 6 と同様の操作で α-グルタミルトランスフェラーゼ活性を測定した。

比較例 8

試料として前記 T3 を用い、比較例 6 と同様の

操作で α -グルタミルトランスフェラーゼ活性を測定した。

比較例 9

試料として前記 T4 を用い、比較例 6 と同様の操作で α -グルタミルトランスフェラーゼ活性を測定した。

比較例 10

試料として前記 T5 を用い、比較例 6 と同様の操作で α -グルタミルトランスフェラーゼ活性を測定した。

比較例 6 ~ 10 の各結果は添付図面第 3 図において一●一として比較例番号を付して示されている。

比較例 10 は負の値を示したため、図には表わされていない。

第 3 図から明らかなように Ozu-CNA を基準として用いる α -グルタミルトランスフェラーゼの活性測定においても、本発明により、溶血によるヘモグロビンの影響が解消されることが示されている。

4. 図面の簡単な説明

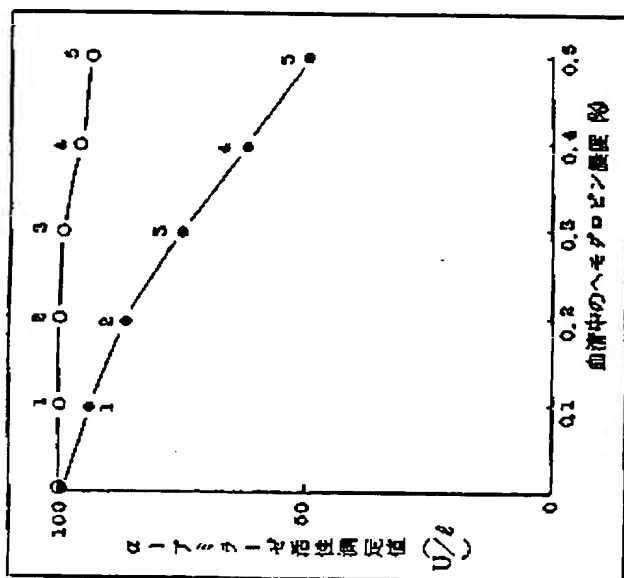
添付図面、第 1 図は前述した本発明の実施例 1 ~ 5 と比較例 1 ~ 5 とによる血清中の α -アミラーゼ活性測定結果をグラフで表したものである。

同第 2 図は、前述した本発明の実施例 6 ~ 10 による血清中の α -アミラーゼ活性測定結果をグラフで表したものである。

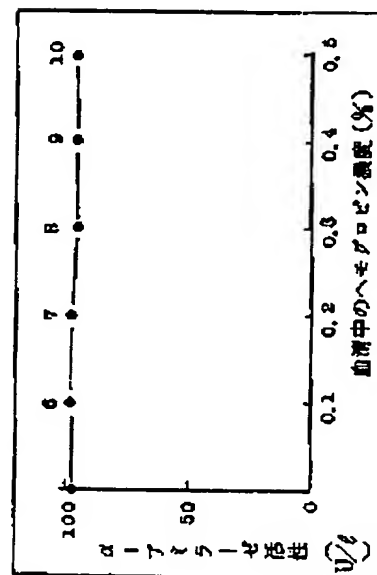
同第 3 図は、前述した本発明の実施例 11 ~ 15 と比較例 6 ~ 9 とによる血清中の α -グルタミルトランスフェラーゼ活性測定結果をグラフで表したものである。

特許出願人 関東化学株式会社

代理人 弁理士 雨 孝 夫



第 1 図



第 2 図

図 2

